



TITLE:

膀胱発癌物質N-〔4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl〕-formamideのラット尿中代謝産物の検討

AUTHOR(S):

林田, 重昭; Wang, Ching Yung; Bryan, George T.

---

CITATION:

林田, 重昭 ...[et al]. 膀胱発癌物質N-〔4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl〕-formamideのラット尿中代謝産物の検討. 泌尿器科紀要 1976, 22(8): 845-855

ISSUE DATE:

1976-12

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/122034>

RIGHT:

膀胱発癌物質 N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]-  
formamide のラット尿中代謝産物の検討Division of Clinical Oncology, University of Wisconsin, Center for Health Sciences,  
Madison, Wisconsin, 53706, U.S.A. (主任: George T. Bryan教授)

林 田 重 昭\*

Ching Yung WANG

George T. BRYAN

ON THE METABOLITES OF N-[4-(5-NITRO-2-FURYL)-2-THIAZOLYL]  
FORMAMIDE AND THEIR MUTAGENIC ACTIVITIES  
IN *SALMONELLA TYPHIMURIUM* TA100

Shigeaki HAYASHIDA, Ching Yung WANG and George T. BRYAN

From the Division of Clinical Oncology, University of Wisconsin

Center for Health Sciences, Madison, Wisconsin 53706

N-(4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl)formamide (FANFT) demonstrated carcinogenic activity for the urinary bladder of many species. The present study sought the metabolites of FANFT in the urine of rats fed this compound, and determined their mutagenic activity for *Salmonella typhimurium* TA100. Three yellow FANFT metabolites, designated as FM 1, FM 2 and FM 3, were present in urine and could be separated by polyvinylpyrrolidone column chromatography or cellulose thin layer chromatography (TLC). The R<sub>f</sub> values on cellulose TLC were 0.89, 0.19 and 0.37 (aqueous 2% methanol) or 0.40, 0.30 and 0.14 (aqueous 6% acetic acid) for FM 1, FM 2 and FM 3, respectively. FM 2 was identified as 2-amino-4-(5-nitro-2-furyl)thiazole (ANFT) by comparison with authentic ANFT.

Three rats were fed a diet containing 0.188% FANFT for 1 week and then were injected i.p. with [<sup>14</sup>C]FANFT. The urine excreted during 24 hours was analyzed by radiochromatography on cellulose plates (aqueous 2% methanol). About 33%, 30% and less than 5% of the radioactivity in the urine were respectively accounted for FM 1, FM 2, and FM 3, and no [<sup>14</sup>C]FANFT could be detected. The cellulose chromatogram was cut into 1 cm long pieces, and each piece was placed in the center of a petri dish containing *Salmonella typhimurium* TA100. Only FM 2 (ANFT) clearly demonstrated mutagenic activity. These data suggest that ANFT may be a proximate metabolite responsible for the induction of bladder cancer in rats fed FANFT.

## 緒 言

近代合成化学工業の発達とともに種々の膀胱発癌物質が発見されている<sup>7,29,45)</sup>。このうち1967年 E. Ertürk<sup>15)</sup> によって N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide (以下 FANFT と略記する) がラット膀胱に

ほぼ 100 % 癌を発生させる強力かつ特異的な膀胱発癌性を有することが報告されていらい、ラット<sup>15,16,34)</sup> はもとよりイヌ<sup>18)</sup>、ハムスター<sup>14)</sup>、マウス<sup>17)</sup> などにもつぎつぎとその膀胱発癌性が明らかにされてきた。

もともと FANFT は N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]acetamide とどうよう尿路感染症の化学療法剤として応用すべく研究されてきたもので、すでに尿中

\* 現勤務地: 山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

になんらかの FANFT 代謝産物の存在は推定されていた。したがって FANFT の強力な特異的膀胱発癌性が明らかにされていらい、FANFT の代謝とくに尿へ排泄される代謝産物の解明は単に FANFT の発癌性の問題にとどまらず、前記した N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]acetamide<sup>8,9,14,18)</sup> を含めた一連の発癌性 nitro-あるいは amino-heterocyclic 化合物<sup>8~11,27)</sup> の発癌機序の解明に非常に興味ある問題となってきた。しかし現在まで FANFT の代謝の研究はアメリカ Wisconsin 大学を中心に徐々にすすめられてはきたが、いまだ FANFT の尿中代謝産物の検討はほとんどなされていない。

最近著者は FANFT を投与しているラット尿より強力な発癌物質である 2-amino-4-(5-nitro-2-furyl)thiazole (以下 ANFT と略記する) を抽出同定、さらに radioisotope [<sup>14</sup>C]FANFT を使い定量するとともに他の 2 種類の FANFT 代謝産物を確認し、*Salmonella typhimurium* TA100 をもちいた mutation test と薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略記する) を組合わせて興味ある成績をえたので報告する。

### 実験準備

化学物質：FANFT, [<sup>14</sup>C]FANFT, ANFT, [<sup>14</sup>C]ANFT の化学名と構造式は Fig. 1 に示す。このうち FANFT は Saber Laboratories, Inc. (Morton Grove, Ill.) より購入した。[<sup>14</sup>C]FANFT, ANFT, [<sup>14</sup>C]ANFT はそれぞれ合成した<sup>32)</sup>。なおこれらの化学物質は実験にあたり前もって TLC でその純粋性を確認した。

実験動物：実験にはすべてメス Sprague-Dawley rat

約 200 g を使用し A. R. Schmidt Co., (Madison, Wis.) より入手した。

Mutation Test の準備：mutation test に使用した *Salmonella typhimurium* TA 100 はカリフォルニア大学 B. N. Ames 教授の好意により入手した。minimal base agar 作成のための Minimal Broth Davis および Bacto Agar は DIFCO Laboratory, (Detroit, Ohio) より購入した。minimal top agar 作成のための L-histidine monohydrochloride は Nutritional Biochemical Co., (Cleveland, Ohio), Biotin は Sigma Chemical Co., (St. Louis, Mo.) より入手した。

その他：TLC プレートは CHROMAGRAM sheet, 13254 cellulose (Eastman Kodak Co., Rochester, N. Y.) をおもに使用し、カラムクロマトグラフィーにもちいた polyvinylpyrrolidone (PVP) は Aldrich Chemical Co., (Milwaukee, Wis.) より入手した。

### 実験 1 FANFT および FANFT 投与ラット尿の Mutation Test

FANFT が強力な特異的膀胱発癌性を有することより尿中になんらかの発癌性代謝産物の存在が推定され、これらの検討のため最近環境性発癌剤のマスクリーニング法として B. N. Ames らを中心として改良されてきた mutation test<sup>1~3,21)</sup> の利用を考えた。とくに 1975 年 J. McCann<sup>21)</sup> によって改良された *Salmonella typhimurium* TA100 は従来の TA1535 シリーズの株で非常に困難であった<sup>2,3,26,42)</sup> nitrofurane や thiazolyl 系化合物の mutagenicity の検出には非常に高い感度を示している<sup>39,43,44)</sup>。

方法：著者の目的からして FANFT やそのラット投与時の尿の mutagenicity の確認はもとよりであるが、

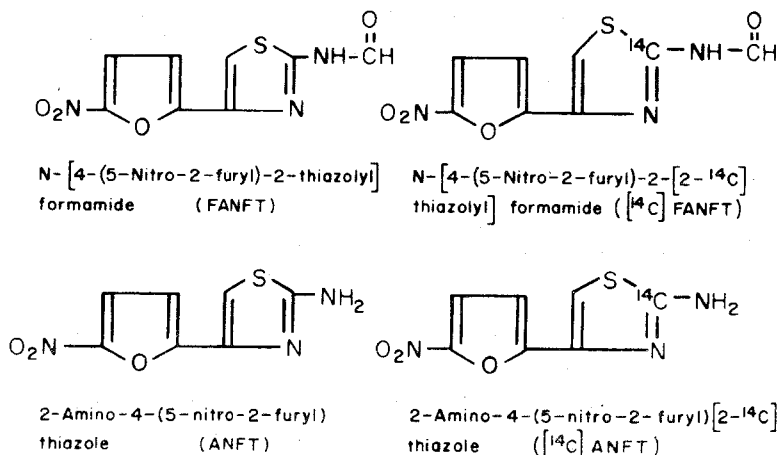


Fig. 1

FANFT の尿中発癌性代謝産物の検索にあるので定性を主とした spot mutation test を選びほぼ B. N. Ames らの方法<sup>1)</sup>に準じておこなった。すなわち minimal base agar 10 ml をプレート (1001 Optilux Petri Dish 100×15 mm styl) に注ぎ固定した。 *Salmonella typhimurium* TA100 を接種し24時間37°C で incubate した nutrient broth より各プレートあたり 0.03 ml を、 L-histidine および biotin をそれぞれ 0.1  $\mu$  mole/2 ml 含む top agar 2 ml に加え振とうし、先の base agar を固定したプレート上に注ぎ再度固定した。

FANFT は dimethyl sulfoxide (以下 DMSO と略記する) に溶解し、検査量は各プレートあたり 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0  $\mu$ g/ $\mu$ l DMSO である。control として DMSO 1 $\mu$ l/プレートをもちいた。尿は3日以上 0.188% FANFT diet を投与しているラットを直接 test tube に排尿させた新鮮尿をもちいた。検査量は 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0  $\mu$ l/プレートである。control として control 食を投与しているラット尿 5 $\mu$ l/プレートをもちいた。これらの検査試料はおののプレート中央にマイクロシリッジをもちいて spot し48時間 37°C で incubate した。そのあと Quebec Colony Counter でプレート上に乳白色として認められる his<sup>+</sup> revertant colony を算定し、円形透明帯としてみられる成長阻止帯を計測した。

判定と成績：mutagenicity の有無の判定はきわめて容易であり、control DMSO および尿プレートには成長阻止帯はまったく認められず、散在的に平均 68/プレートの revertant colony を認めたにすぎなかった。いっぽう FANFT および FANFT 投与ラット尿にはいずれも明確な円形の成長阻止帯を認め、その外

周に多数の revertant colony が認められた。著者は spot mutation test を定量試験にもちいることには問題も多いと考えているが、発癌物質のスクリーニングそのものではなく尿中発癌性代謝産物の検索にもちいる意味でつぎのごとく定めた。すなわち検査試料のプレート上の revertant colony 数より control プレートの revertant colony 数68をひき100以上を卅、75以上を卅、50以上を十、25以上を土とし以下にすべてーとした。成績はまとめて Table 1 に示し2～3の例を Fig. 2 に紹介する。Table 1 でもわかるように成長阻止帯は検査量の増加に伴って FANFT および FANFT 投与ラット尿ともに大きくなっているが、revertant colony 数のほうは mutagenicity の有無では明らかに差があるが比較的ばらつきが多く量的相関は認めなかった。

## 実験2 FANFT ラット尿中代謝産物の抽出

実験1で明らかのごとく FANFT を経口投与しているラット尿には *Salmonella typhimurium* TA100 に対する強力な mutagen の排出があり、さらに FANFT が特異的膀胱発癌性を有することより FANFT のラット尿中代謝産物の抽出を企画した。

方法：種々の有機溶媒抽出を試みたが困難であり、FANFT の尿中代謝産物の不安定なことも考慮して冷暗室での溶出溶媒として蒸留水をもちいた polyvinylpyrrolidone カラムクロマトグラフィーをもちいた。尿採集は1回につきメス Sprague-Dawley ラット10～15匹を使用し FANFT 50～100 mg/ラットを corn oil に混入して胃管により胃内に投与した。metal metabolic cage で糞と分離し24時間尿を採集、すぐ遠沈し若干の汚染物をのぞき清明な尿を冷凍乾燥し保存、約

Table 1. Spot mutation test with *S. typhimurium* TA 100

Material	FANFT ( $\mu$ g/1 $\mu$ l DMSO)	Urine ( $\mu$ l)	Diameter of growth inhibition (mm)	No. of his <sup>+</sup> revertant colonies
DMSO (control)	0		0	—
FANFT	0.05		29	卅
	0.1		35	卅
	0.5		37	卅
	1.0		47	卅
	5.0		55	卅
Control urine		5	0	—
FANFT urine		0.1	19	卅
		0.5	20	卅
		1.0	23	卅
		2.0	25	卅
		5.0	30	卅

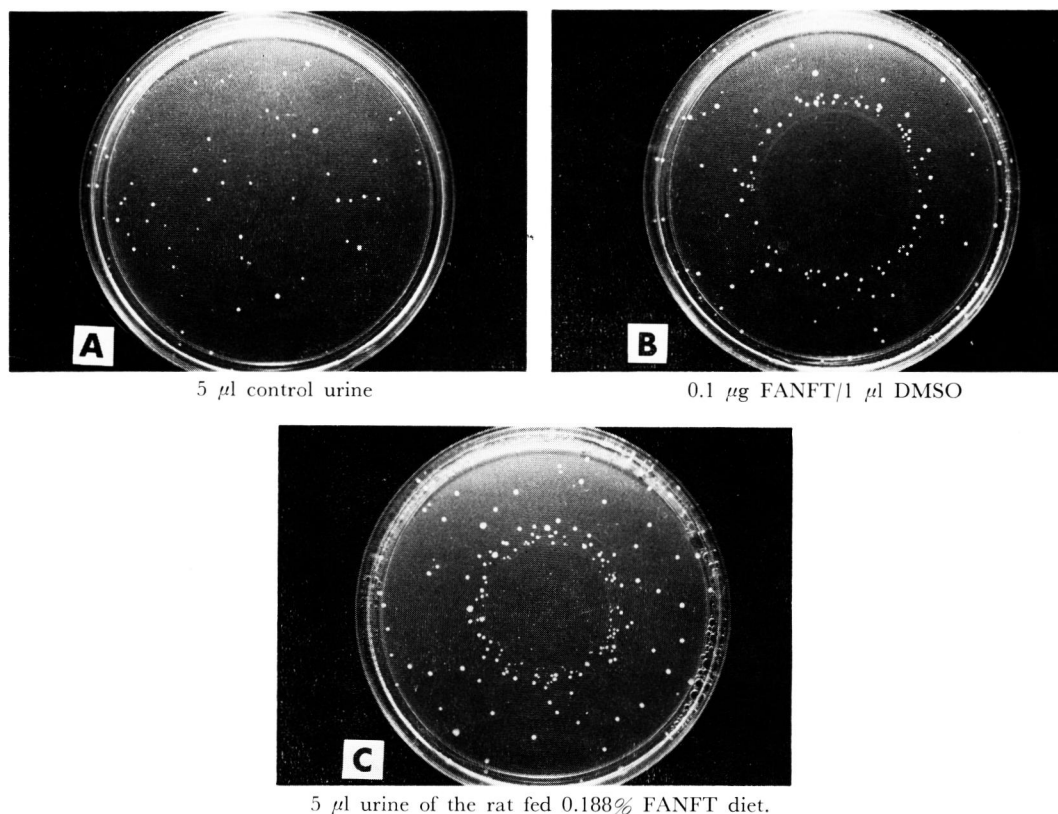


Fig. 2. Spot mutation test with *Salmonella typhimurium* TA 100.

100四分の尿を採集し尿中 FANFT 代謝産物の抽出に供した。

polyvinylpyrrolidone カラムは径 6 cm, 高さ 80 cm で恒温度 4°C の冷暗室にセットされ前述したラット 100四分の冷凍乾燥尿を約 100 ml の蒸留水に溶かし遠沈, その上清液のみを使用し蒸留水で溶出した。polyvinylpyrrolidone カラムクロマトグラムは Fig. 3 に示すように正常尿には認められない 3 つの黄色帯が認められ, それぞれ早く流出してくる順に FM1, FM2, FM3 と仮称した。これらの FM1, FM2, FM3 分画はそれぞれ分取し蒸留濃縮をおこなったがかなりの不純物を含んでいた。とくに FM1 分画には多量の正常尿代謝物を含み, 再度の cellulose カラムクロマトグラフィーや chloroform, ether などによる有機溶媒抽出も試みたがいまだ抽出するに至っていない。FM2 分画は TLC 上で 4 ~ 6 種の少量の不純物を含んでいた。さらに冷凍乾燥後少量の methanol で溶かしガラスフィルターで不純沈殿物を除去したあと, 少量の蒸留水を加え -20°C 冷凍庫に静置した。20 時間後少量の褐色沈殿物が認められ, これをガラスフィルターで採集し蒸留水で 5 回洗ったあと再度完全に乾燥した。

この結果種々の TLC でも不純物をまったく認めない FANFT のラット尿中代謝産物 FM2 をえた。さらにこの FM2 は TLC で検討され ANFT と同定された。FM3 分画の 4000 ml は 10 ml に蒸留濃縮され TLC で検討されたがかなりの不純物を含むため, さらに完全に乾燥されたあと少量の methanol に溶解

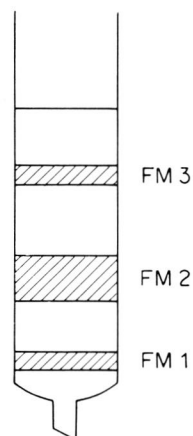


Fig. 3 PVP column chromatography of urine of rats fed FANFT

少量の ethyl acetate を加え $-20^{\circ}\text{C}$  冷凍庫に静置した。5日後生じた褐色の沈殿物をガラスフィルターで採集し 100% ethyl acetate で5回洗い完全に乾燥した。TLC で検討した結果不純物は認められず、ほぼ純粋な FANFT 尿中代謝産物 FM3 であるとして結局約 2 mg をえた。現在構造決定をおこなっているがまだその構造の確定にいたっていない。

成績：以上のごとく著者は FANFT ラット尿中代謝産物として3つの物質 FM1, FM2, FM3 を確認し、そのうち FM2 は FANFT の formyl 基が水素置換した ANFT であると同定した。これら FM2 (ANFT) を含め FM1, FM3 の TLC 上での性質は Table 2 に示す。

### 実験3 FANFTのラット尿中代謝産物ANFTの定量と TLG 分画 Mutation Test による発癌性代謝産物検索の試み

[ $^{14}\text{C}$ ]FANFT を使用しラット尿中代謝産物 FM2 (ANFT), FM1 および FM3 の定量を試みるとともに最近環境性発癌物質のマススクリーニングテストとして注目されてきた mutation test に TLC を組合わせ薄層クロマトグラフィー分画 mutation test (仮称)として FANFT のラット尿中発癌性代謝産物の検索の試みをおこなった。

方法：1週間 0.188% FANFT diet を自由摂取しているラット3匹を使用した。各ラットは [ $^{14}\text{C}$ ] FANFT 0.9  $\mu\text{Ci}$  (0.2  $\mu\text{Ci}/1\mu\text{mole}$ ) 10.2 ml DMSO 溶液を腹腔内に注射し、同時に尿の汚染などを防止する意味で肛門を縫合閉鎖しそれぞれ metal metabolic cage に入れ24時間尿を採集した。その間水および diet の投与は中止した。尿の採集にあたっては FANFT の尿中代謝産物の自然分解や尿中細菌などの影響を極力防止するため尿は氷をつめた  $0^{\circ}\text{C}$  の ice box に導いた。このようにして慎重に採集された尿は cellulose TLC sheet に約 10  $\mu\text{l}$ , 2 cm の線状に spot され 2% methanol および 2% formic acid solvent system で TLC をおこなった。16 cm まで TLC を展開したあとこれらは完全に乾燥され、U-V light 下で検査のうえそれぞれ 1 cm 幅に切り6個の分画切片とした。それぞれの分

画切片は counting vial に入れ ANPO<sup>38)</sup> 15 ml を加え振とう後 Mark II Liquid Scintillation System (Nuclear Chicago, Chicago, Ill.) で各分画の radioactivity を測定した。

TLC 分画 mutation test は実験1で述べた方法で作成した *Salmonella typhimurium* TA100 の agar プレートを使用した。尿 15  $\mu\text{l}$  は同じように TLC sheet に 3 cm の線状に spot し、2% methanol solvent system で 16 cm まで展開したあと乾燥し、その中央 1 cm を使用し幅 1 cm の分画切片16個を作った。この 1 cm 四方の切片はそれぞれ用意した agar プレート中央におき48時間  $37^{\circ}\text{C}$  で incubate したあと実験1で述べた spot mutation test 判定規準にあわせ検討した。なお control として正常尿を用いてどのような操作をおこなった cellulose sheet をもちいた。

成績：Fig. 4 に示すように FM2 (ANFT) 分画と FM1 分画に著明な radioactivity を認めた。半面 FM3 分画にはきわめて低い radioactivity を認めたにすぎなかった。とくに FM2 (ANFT) はほんのわずかのテーリングはあるが明瞭な spot として認められ、腹腔内投与した [ $^{14}\text{C}$ ] FANFT の尿中代謝産物のうち  $30.8 \pm 9.4\%$  が ANFT として排出されることが明らかとなった。なお腹腔内投与した [ $^{14}\text{C}$ ] FANFT の [ $^{14}\text{C}$ ] の24時間尿中回収率は  $31.3 \pm 6.1\%$  であった。

TLC 分画 mutation test は尿 TLC 分画 radioactivity および FM1, FM2 (ANFT), FM3 の TLC の結果と平行して同じく Fig. 4 に示す。また個々の mutation test のうち数例を Fig. 5 に供覧する。一見してわかるように FM2 (ANFT) 分画に著明な mutagenicity が認められ、実験1に示した FANFT 投与時のラット尿の mutagenic activity を考えると、その尿中代謝産物としての ANFT の重要性をはっきり物語っている。また FM1 分画および FM3 分画にも若干の mutagenicity の存在が疑われたが非常に弱いようでもあり、今後さらに検討すべきであると考えている。

## 考 察

尿中に存在するある種の発癌物質が膀胱腫瘍発生に深く関与しているであろうことが従来より推定されて

Table 2. Detection of FANFT metabolites in the rat urine by TLC

Metabolites	Rf values		Color	
	2% Methanol	6% Acetic acid	Visible light	U-V light
FM 1	0.89	0.40	Yellow	Dull Brown
FM 2 (ANFT)	0.19	0.30	Yellow	Dull Orange
FM 3	0.37	0.14	Yellow	Dull Brown

おり<sup>22,31)</sup>、また最近種々の化学発癌物質はもとより自然界に存在する膀胱発癌物質の尿中発癌性代謝産物の検索がなされている<sup>4~6, 13, 19, 23, 24, 28, 30)</sup>。

前述したように FANFT は1966年 nitrofuran 系化合物の発癌性の検討直後<sup>33)</sup>、1967年ラットに強力な特異的膀胱発癌性を有することが報告<sup>15)</sup>され、いろいろ種々の実験動物でその膀胱発癌性が確認された<sup>14~18, 34)</sup>ばかりでなく、これらの検討は N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]acetamide をはじめとして、さらに nitrofuran 系化合物を中心とした一連の nitro-あるいは amino-heterocyclic 化合物の発癌性の検討<sup>8~12, 14, 18, 27)</sup>を促し、数年前の 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2) の問題もまた nitrofuran 化合物として注目をあつめ現在その発癌性が証明されてきている<sup>39)</sup>。しかしこれら一連の発癌物質による発癌がいかなる機序で起こるかはもとより、これらが体内に取りこまれたあとどのような代謝を受けてその発癌物質独特の標的発癌部位に達するのかほとんど明らかにされていない。著者はこれら一連の発癌機序解明のため、それらの代表ともいえる FANFT がラットに強力な特異的膀胱発癌性を有していることに着目して FANFT 投与

中のラット尿中になんらかの発癌性代謝産物の存在があるのではないかと推定し FANFT のラット尿中代謝産物の検討をおこなった。

現在まで FANFT の代謝における知見として1970年 G. M. Lower, Jr. ら<sup>20)</sup>は FANFT のマウス投与後における第1次の代謝が formal 基に  $[^{14}\text{C}]$  をつけた  $[^{14}\text{C}]$ -FANFT においてはすみやかに呼気中に62%の  $[^{14}\text{C}]$  が証明されるいっぽう、thiazolyl 核に  $[^{14}\text{C}]$  をつけた場合にはほとんど呼気中には  $[^{14}\text{C}]$  が証明されずおもに尿中に排泄されることを明らかにして FANFT のマウス体内における第1次の代謝が formyl 基の水素置換による ANFT の形成によるものであると推定したが尿中の ANFT 証明は不成功に終わっている。いっぽう C. Y. Wang ら<sup>35)</sup>は *in vitro* において種々の実験動物の肝、胃、腎、小腸に formamidase の存在を明らかにし、さらに各臓器の FANFT formamidase activity を測定している。以上の報告と著者の明らかにした FANFT のラット尿中代謝産物すなわち ANFT, FM1, FM3 の存在を考えると Fig. 6 に示すような FANFT の代謝が考えられる。すなわちラット体内に摂取された FANFT は体内の諸臓器で formamidase

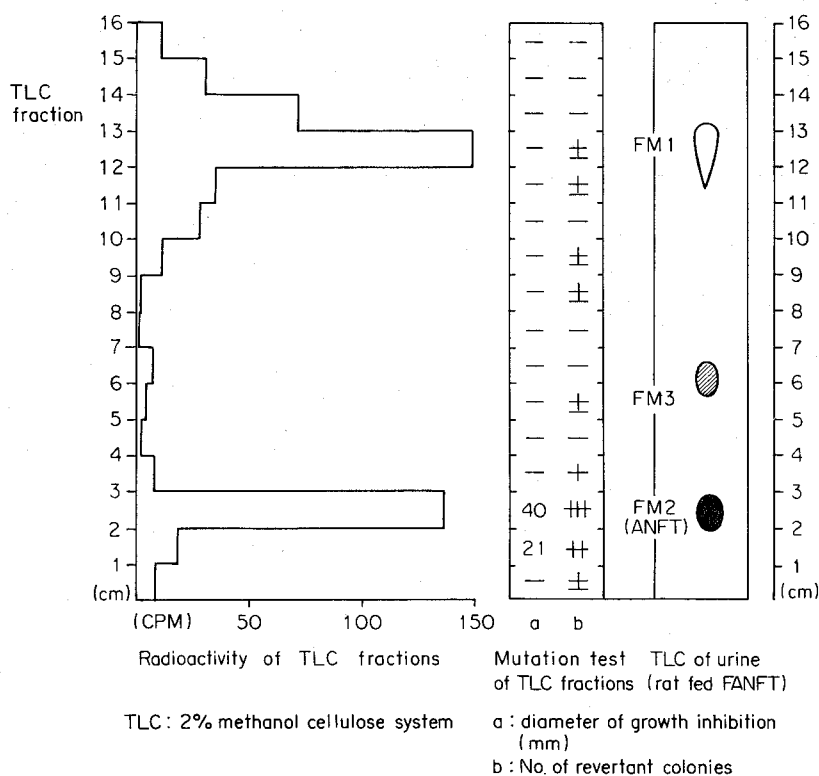


Fig. 4

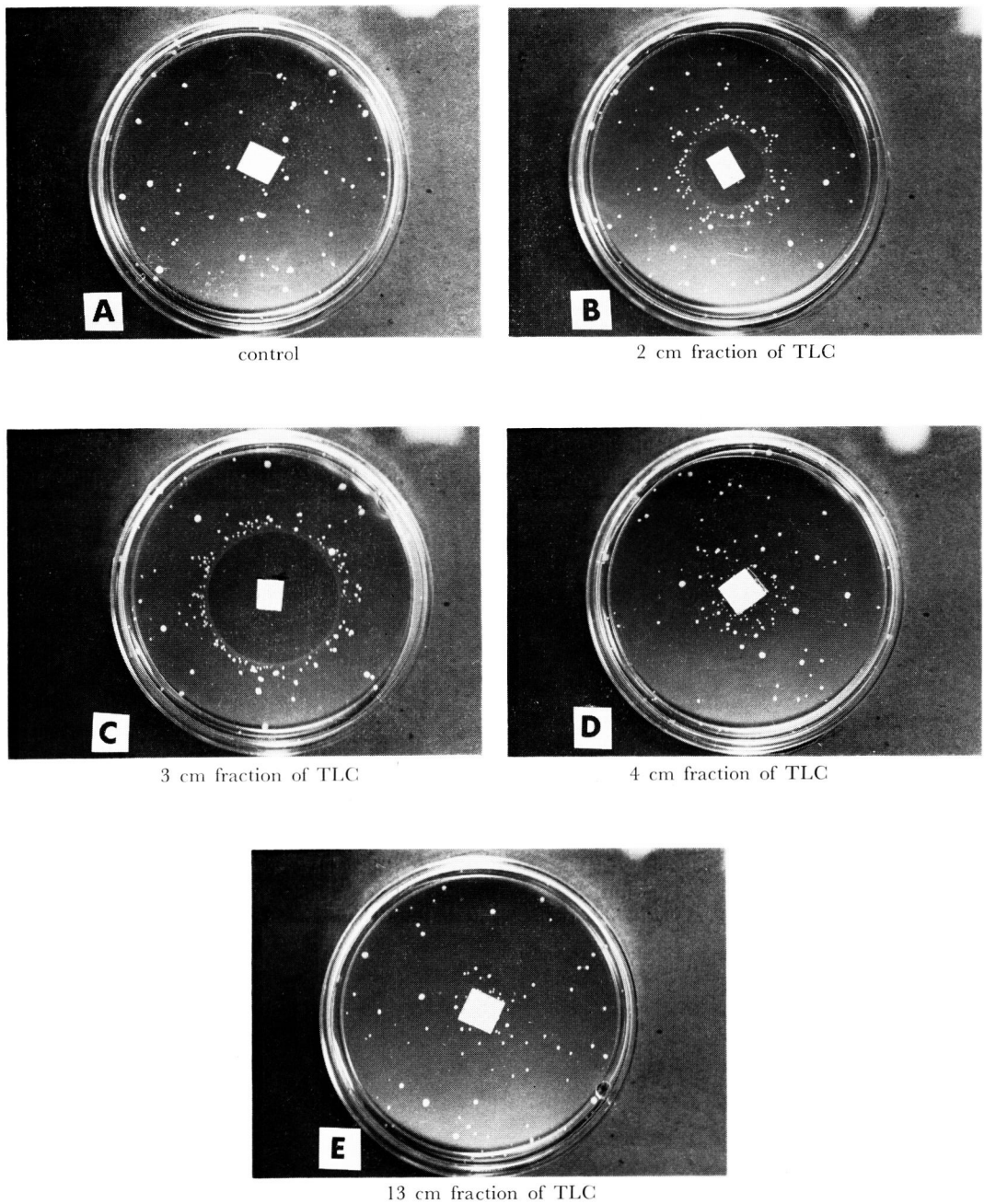


Fig. 5. Mutation test with *Salmonella typhimurium* TA100 of TLC fractions of urine of the rat administrated with FANFT



のはたらきで速やかに ANFT に代謝されることは明らかであり、この生成された ANFT はその一部がその後ほとんどなんの変化も受けずに尿中に排泄されることになる。その量は著者の測定で明らかのように FANFT の尿中代謝産物の約30%である。そしてその同量あるいはそれ以上の排泄が2% methanol-cellulose TLC で著者のいう FANFT 代謝産物 FM1 の部位に排泄され、これは2% formic acid-cellulose TLC でも同様であり、おそらく FM1 は ANFT と同量あるいはそれよりやや多量の FANFT のラット尿中代謝産物であると考えられる、半面 FM3 はきわめて少量である。いっぽうラットをはじめイヌ、マウスなどの種々の実験動物の肝、胃、小腸、腎、筋、肺などに一連のニトロ化合物の代謝をおこなう nitroreductase enzyme system が明らかにされている<sup>20, 36-38</sup>。すなわちこれらのことは FANFT の第1次の代謝産物である ANFT がさらに代謝を受けるであろうことを明らかにしているといえる。以上のことを総合して考えると FANFT のラット体内における第1次の代謝で生成された ANFT はその一部がそのまま尿中に排泄されるのであるが残りにはさらに nitroreductase enzyme system を中心とした metabolic system により代謝を受ける。すなわち ANFT のさらに代謝されたものが著者の確認した FM1 および FM3 であると推定される。

つぎに著者の検討した mutation test と TLC を応用した TLC 分画 mutation test の成績であるが、この結果は FANFT のラット尿中代謝産物のうち FM2 (ANFT) 分画にのみ著明な mutation が証明され、

FM1, FM3 分画にはほとんど mutagenicity は認められなかった。もちろん FM1, FM3 はさらに検討する必要はあるが FANFT 投与時のラット尿の mutagenic activity はまったくその代謝産物 ANFT によることが確認された。これらのことは現在のところ mutagenicity と carcinogenicity とがまったく平行関係にあるとはいいがたい<sup>44)</sup>が、mutagenicity を有するものは carcinogenicity を有する可能性がきわめて強く<sup>25)</sup>、とくに著者が使用した *Salmonella typhimurium* TA100 は nitrofurantoin あるいは nitrothiophene, nitropyrrole, nitroimidazole, aminothiophene, aminothiazole などの一連の化合物の mutagenicity と carcinogenicity とはきわめてよく一致しており<sup>39, 43)</sup>、また ANFT じたいの強い発癌性もすでに証明されている<sup>8)</sup>点からしても ANFT が FANFT の proximate carcinogen であることは明らかであり、これが直接尿中に大量に排出され、膀胱粘膜が常に高濃度の ANFT にさらされていることはラットにおける FANFT の特異的膀胱発癌性を考えるとき、その発癌機序に重大な示唆を示すものと思われる。最近さらに [<sup>14</sup>C] FANFT 尿中代謝産物がラット膀胱に高度に取り込まれることが明らかになり<sup>40)</sup>、また *in vitro* において ANFT がラット膀胱上皮細胞の macromolecule に取り込まれることが明らかになってきている<sup>41)</sup>。しかし現在まで ANFT の代謝や臓器特異性などはじゅうぶん検討されているとはいいがたく、わずかにマウスに経口投与されてその胃発癌性が証明されたにすぎず、今後は FANFT の ANFT 以外の代謝産物の検討はもちろんであるが、さらに ANFT に注意を向けその代謝ならびに膀胱発

Metabolism of FANFT in Rats

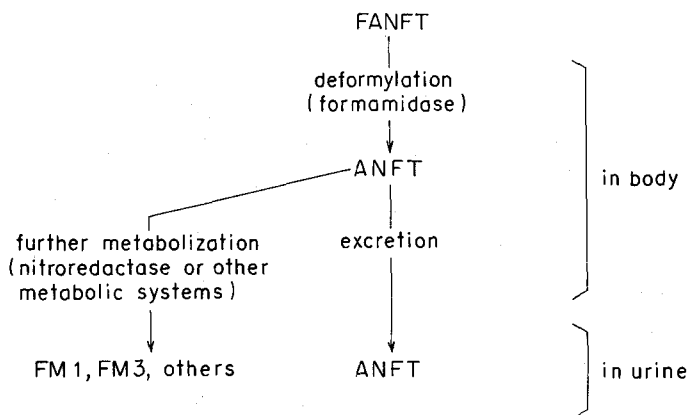


Fig. 6

癌性などの検討をする必要があると思う。

最後に著者のおこなった TLC 分画 mutation test であるがほとんど ANFT (FM2 分画) に mutation が集中している。最近著者は大量の FM1 および FM3 も弱い mutagenicity を有しているのではないかと考えているが、著者がこの TLC 分画 mutation test で主張したいのは FANFT を 0.188% 投与したときのラット尿中に存在する相対的な mutagenicity である。もちろん個々の物質の有する mutagenicity も重大な問題ではあるが前述したように著者の関心は膀胱癌を発生するような状態での尿中発癌性代謝産物の検討にあり、すべての代謝産物の検出にあるのではない。したがってその尿の TLC 分画 mutation test で量的質的にも強い mutagenic activity を認めた FM2 すなわち ANFT に重点をおくことは論をまたない。もちろんまだ mutation test じたいが発癌物質のスクリーニングに用いられる程度で前述したように mutagenicity と carcinogenicity とが完全な平行関係にあるとはいえないが、最近ますます改善され、さらに発展すると思われる。いっばう現在でも多くの発癌物質においてその mutagenicity と carcinogenicity とはきわめて一致しており、著者の試みた TLC 分画 mutation test は発癌物質の尿中代謝産物の mutagenic activity をその相対的關係において検討しうらただけでなく、周知のように TLC じたいが物質の分離抽出あるいはその存在の決定に強力なそして不可欠の手段である。したがって尿中あるいは血中の発癌性代謝産物の検出はもとより mutation test にもちいる菌の改良とともに種々の化学発癌剤の検討、さらにまた自然環境にある発癌性物質の検索に今後さらに広く活用できるものと思う。

## 結 語

(1) FANFT を投与されたラット尿中にはその代謝産物として絶食無飲水24時間で約30%が尿中へ排泄され、その尿中代謝産物としてカラムクロマトグラフィーおよび TLC で3つの代謝産物が確認され、それぞれ FM1, FM2, FM3 と仮称した。

(2) FANFT の尿中代謝産物 FM2 は FANFT の deformylation した発癌物質 ANFT であることを証明し、その排泄は FANFT 尿中代謝産物中約30%であることを明らかにした。

(3) FM1 および FM3 の TLC での性状を示し、FM1 は FANFT の尿中代謝産物中約30%あるいはそれ以上である。半面 FM3 はごく少量であることがわかった。

(4) FANFT 投与中のラット尿は *Salmonella typhimurium* TA 100 に強い mutagenic activity を有することを認め、TLC 分画 mutation test を試み FANFT 投与時のラット尿の mutagenic activity はその発癌性代謝産物 ANFT によることを示すとともに発癌性物質の検討に対し TLC 分画 mutation test の有用性を強調した。

(5) FANFT の代謝とくに尿中への代謝を中心に考察し、TLC 分画 mutation test で明らかにした尿中代謝産物の相対的 mutagenic activity の観察より ANFT の重要性に注意し、今後さらに検討を加える必要があると考える。

## ACKNOWLEDGEMENTS

Supported in part by USPHS Research Grants CA 10017, CA 11946, CA 14520 and CA 17449 from the National Cancer Institute.

We thank Dr. Osamu Yoshida for his criticism on the manuscript, Mrs. L. H. Lee for expert assistance with the experiments and Mrs. D. Scott for the preparation of the manuscript.

## REFERENCES

- 1) Ames, B. N.: The Detection of Chemical Mutagens with Enteric Bacteria in: A. Hollaender (ed.). Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection. Vol. 1, pp. 267 ~282. New York: Plenum Press, 1971.
- 2) Ames, B. N., Lee, F. D. and Durston, W. E.: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. (US), **70**: 782~786, 1973.
- 3) Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E. and Lee, F. D.: Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. Proc. Natl. Acad. Sci. (US), **70**: 2281~2283, 1973.
- 4) Brown, R. R., Price, J. M., Satter, E. J. and Wear, J. B.: The Metabolism of Tryptophan in Patients with Bladder Cancer: Acta Union Intern. Contre Cancrum, **16**: 229~303, 1960.
- 5) Bryan, G. T., Brown, R. R. and Price, J. M.: Incidence of Mouse Bladder Tumors Following Implantation of Paraffin Pellets Containing

- Certain Tryptophan Metabolites. *Cancer Res.*, **24**: 582~585, 1964.
- 6) Bryan, G. T., Brown, R. R. and Price, J. M.: Mouse Bladder Carcinogenicity of Certain Tryptophan Metabolites and Other Aromatic Nitrogen Compounds Suspended in Cholesterol. *Cancer Res.*, **24**: 596~602, 1964.
  - 7) Clayson, D. B. and Cooper, E. H.: *Advances in Cancer Research*, Vol. 13, (ed. Klein, G. and Weinhouse, S.), Academic Press, New York and London, 1970.
  - 8) Cohen, S. M., Lower, Jr. G. M., Ertürk, E. and Bryan, G. T.: Comparative Carcinogenicity in Swiss Mice of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]-acetamide and Structurally Related 5-Nitrofurans and 4-Nitrobenzenes. *Cancer Res.*, **33**: 1593~1597, 1973.
  - 9) Cohen, S. M., Ertürk, E., Von Esch, A. M., Crovetti, A. J. and Bryan, G. T.: Carcinogenicity of 5-Nitrofurans, 5-Nitroimidazoles, 4-Nitrobenzenes, and Related Compounds. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**: 403~417, 1973.
  - 10) Cohen, S. M., Ertürk, E. and Bryan, G. T.: Comparative Carcinogenicity of 5-Nitrothiophenes and 5-Nitrofurans in Rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, **56**: (in press), 1976.
  - 11) Cohen, S. M., and Bryan, G. T.: Carcinogenesis Caused by Nitrofurans Derivatives. In: *Pharmacology and the Future of Man. Proceedings of the 5th International Congress on Pharmacology*, Vol. 2, pp. 164~170, Basel, Switzerland: S. Karger, A. G., 1973.
  - 12) Cohen, S. M., Ertürk, E., Von Esch, A. M., Crovetti, A. J. and Bryan, G. T.: Carcinogenicity of 5-Nitrofurans and Related Compounds with Aminoheterocyclic Substituents. *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**: 841~850, 1975.
  - 13) Cramer, J. W., Miller, J. A. and Miller, E. C.: N-Hydroxylation: A New Metabolic Reaction observed in the Rat with the Carcinogen 2-AAF. *J. Biol. Chem.*, **235**: 885~888, 1960.
  - 14) Croft, W. A. and Bryan, G. T.: Production of Urinary Bladder Carcinomas in Male Hamsters by N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide, N-(4-[5-Nitro-2-furyl]-2-thiazolyl)acetamide, or Formic Acid 2-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]hydrazide. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**: 941~949, 1973.
  - 15) Ertürk, E., Price, J. M., Morris, J. E., Cohen, S., Leith, R. S., Von Esch, A. M. and Crovetti, A. J.: The Production of Carcinoma of the Urinary Bladder in Rats by Feeding N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide. *Cancer Res.*, **27**: 1998~2002, 1967.
  - 16) Ertürk, E., Cohen, S. M., Price, J. M. and Bryan, G. T.: Pathogenesis, Histology and Transplantability of Urinary Bladder Carcinomas Induced in Albino Rats by Oral Administration of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide. *Cancer Res.*, **29**: 2219~2228, 1969.
  - 17) Ertürk, E., Cohen, S. M. and Bryan, G. T.: Urinary Bladder Carcinogenicity of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide in Female Swiss Mice. *Cancer Res.*, **30**: 1309~1311, 1970.
  - 18) Ertürk, E., Atassi, S. A., Yoshida, O., Cohen, S. M., Price, J. M. and Bryan, G. T.: Comparative Urinary and Gall Bladder Carcinogenicity of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide and N-[4-(5-Nitro-2-thiazolyl)acetamide in Dog. *J. Natl. Cancer Inst.*, **45**: 535~542, 1970.
  - 19) Hashimoto, Y., Suzuki, E. and Okada, M.: Induction of Urinary Bladder Tumor in ACI/N Rats by Butyl(3-carboxypropyl)nitrosamine, A Major Urinary Metabolite of Butyl (4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Gann*, **63**: 637~638, 1972.
  - 20) Lower, Jr. G. M. and Bryan, G. T.: Metabolic Activation of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide (FANFT): A Bladder Carcinogen. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **12**: 3, 1971.
  - 21) McCann, J., Spingarn, N. E., Kabori, J. and Ames, B. N.: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strain with R Factor Plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)*, **72**: 979~983, 1975.
  - 22) McDonald, D. F. and Lund, R. R.: The Role of the Urine in Vesical Neoplasm. I. Experimental Confirmation of the Urogenous Theory of Pathogenesis. *J. Urol.*, **71**: 560~570, 1957.
  - 23) Miller, E. C., Miller, J. A. and Hartmann, H. A.: N-Hydroxy-2-acetylaminofluorene: A Metabolite of 2-Acetylaminofluorene with Increased

- Carcinogenic Activity in the Rat. *Cancer Res.*, **21**: 815~825, 1961.
- 24) Miller, J. A., Cramer, J. W. and Miller, E. C.: The N- and Ring-hydroxylation of 2-Acetylaminofluorene during Carcinogenesis in the Rat. *Cancer Res.*, **20**: 950~962, 1960.
- 25) Miller, J. A. and Miller, E. C.: Metabolic Activation and Reactivity of Chemical Carcinogens. *Mutation Res.*, **33**: 25~26, 1975.
- 26) McCalla, D. R., Voutsions, D. and Olive, P. L.: Mutagen Screening with Bacteria: Niridazoles and Nitrofurans. *Mutation Res.*, **31**: 31~37, 1975.
- 27) Morris, J. E., Price, J. M., Lalich, J. J. and Stein, R. J.: The Carcinogenic Activity of Some 5-Nitrofurans in Rats. *Cancer Res.*, **29**: 2145~2156, 1969.
- 28) Price, J. M., Wear, J. B., Brown, R. R., Satter, E. J. and Olson, C.: Studies on Etiology of Carcinoma of Urinary Bladder. *J. Urol.*, **83**: 376~382, 1960.
- 29) Price, J. M.: Benign and Malignant Tumors of the Urinary Bladder, (Ed., Maltry, E.), pp. 197~225, Medical Examination Publishing Co., Inc., New York, 1970.
- 30) Okada, M., Suzuki, E., Aoki, J., Miyoshi, M., Kurashima, C., Miyajima, K., and Hashimoto, Y.: Studies on the Correlation of Structure and Metabolism with Organotropic Carcinogenicity to the Urinary Bladder of N-Nitrosodialkylamines and Related Compounds. The 5th Symp. on Drug Metabolism and Action, in Shizuoka, Japan, Nov. 9 to 10, 1973.
- 31) Scott, W. W. and Boyd, H. S.: A Study of the Carcinogenic Effect of  $\alpha$ -Naphthylamine on the Normal and Substituted Isolated Sigmoid Loop Bladder of Dogs. *J. Urol.*, **70**: 914~924, 1953.
- 32) Sherman, W. R. and Dickson, D. E.: 4-(5-Nitro-2-furyl)thiazoles. *J. Org. Chem.*, **27**: 1351~1355, 1962.
- 33) Stein, R. J., Yost, D., Petrolunas, F. and Von Esch, A.: Carcinogenic Activity of Nitrofurans, A Histologic Evaluation. *Federation Proc.*, **25**: 291, 1966.
- 34) Tiltman, A. J. and Friedell, G. H.: The Histogenesis of Experimental Bladder Cancer. *Invest. Urol.*, **9**: 218~226, 1971.
- 35) Wang, C. Y. and Bryan, G. T.: Deacetylation of Carcinogenic 5-Nitrofurans Derivatives by Mammalian Tissues. *Chem. Biol. Interact.*, **9**: 423~428, 1974.
- 36) Wang, C. Y., Behrens, B. C., Ichikawa, M. and Bryan, G. T.: Nitroreduction of 5-Nitrofurans Derivatives by Rat Liver Xanthine Oxidase and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Cytochrome C Reductase. *Biochem. Pharmac.*, **23**: 3395~3403, 1974.
- 37) Wang, C. Y., Chiu, C. W. and Bryan, G. T.: Nitroreduction of Carcinogenic 5-Nitrothiophenes by Rat Tissues. *Biochem. Pharmac.*, **24**: 1563~1568, 1975.
- 38) Wang, C. Y., Chiu, C. W. and Bryan, G. T.: Metabolism and Disposition of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] acetamide in the Rat. *Drug. Met. Dispo.*, **3**: 89~95, 1975.
- 39) Wang, C. Y., Muraoka, K. and Bryan, G. T.: Mutagenicity of Nitrofurans, Nitropyrroles, Nitroimidazoles, Aminothiophenes, and Aminothiazoles In *Salmonella typhimurium*. *Cancer Res.*, **35**: 3511~3617, 1975.
- 40) Wang, C. Y. and Hayashida, S.: Unpublished Data.
- 41) Wang, C. Y.: Unpublished Data.
- 42) Yahagi, T., Nagao, M., Hara, K., Matsushima, T., Sugimura, T. and Bryan, G. T.: Relationships Between the Carcinogenic and Mutagenic or DNA-modifying Effects of Nitrofurans Derivatives, Including 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, A Food Additive. *Cancer Res.*, **34**: 2266~2273, 1974.
- 43) Yahagi, T., Matsushima, T., Nagao, M., Seino, Y., Sugimura, T., and Bryan, G. T.: Mutagenicity of Nitrofurans Derivatives on a Bacterial Tester Strain with an R Factor Plasmid. *Mutation Res.*, **40**: 9~14, 1976.
- 44) 矢作多貴江：環境中の発癌物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について。蛋白・核酸・酵素, **20**: 1178~1189, 1975.
- 45) 吉田 修：膀胱腫瘍の発生要因に関する研究。日泌尿会誌, **64**: 707~712, 1973.

(1976年5月8日受付)